





© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	2
4 Syarat bahan baku, bahan penolong dan bahan lainnya	2
5 Syarat mutu dan keamanan produk.....	3
6 Pengambilan contoh	4
7 Cara uji	4
8 Teknik sanitasi dan higiene	5
9 Peralatan	5
10 Teknik penanganan dan pengolahan	5
11 Syarat pengemasan.....	7
12 Pelabelan.....	7
Lampiran A (normatif) Lembar penilaian sensori.....	8
Lampiran B (informatif) Diagram alir proses pengolahan ikan asap dengan pengasapan panas.....	9
Lampiran C (normatif) Metode uji Malachite green dan Leucomalachite green	10
Lampiran D (normatif) Metode uji benzo[a]piren	13
Bibliografi	15
 Gambar B.1 – Diagram alir proses pengolahan ikan asap dengan pengasapan panas	 9
Gambar D.1 - Skema prosedur pembersihan/pemurnian	14
 Tabel 1 - Persyaratan mutu dan keamanan ikan asap dengan pengasapan panas	 3
Tabel A.1 - Lembar penilaian sensori ikan asap dengan pengasapan panas	8

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas ikan asap dengan pengasapan panas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini merupakan revisi dari:

SNI 2725.1:2009, *Ikan asap - Bagian 1: Spesifikasi;*

SNI 2725.2:2009, *Ikan asap - Bagian 2: Persyaratan bahan baku;*

SNI 2725.3:2009, *Ikan asap - Bagian 3: Penanganan dan pengolahan.*

Standar ini hanya berlaku untuk ikan asap dengan pengasapan panas, sedangkan untuk ikan asap dengan pengasapan dingin akan disusun standar tersendiri.

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan, yang telah dirumuskan melalui rapat teknis dan rapat konsensus pada tanggal 13 Juli 2012 di Bandung dihadiri oleh wakil dari produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

1. Undang-Undang Nomor 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
2. Undang-Undang Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Undang-Undang Nomor 45 Tahun 2009 tentang Perubahan atas Undang-Undang Nomor 31 Tahun 2004 tentang Perikanan.
4. Peraturan Pemerintah Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
5. Peraturan Pemerintah Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air.
6. Peraturan Pemerintah Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
8. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor PER.15/MEN/2011 tentang Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan yang Masuk ke dalam Wilayah Negara Republik Indonesia.
9. Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI Nomor HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.
10. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor KEP.06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
11. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor KEP.01/MEN/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 12 September 2012 sampai dengan 11 November 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Ikan asap dengan pengasapan panas

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu dan keamanan pangan ikan asap dengan pengasapan panas, bahan baku, bahan penolong, penanganan dan pengolahan ikan asap.

Standar ini berlaku untuk ikan asap yang mengalami pengasapan panas dan tidak berlaku untuk produk yang mengalami pengolahan lebih lanjut.

2 Acuan normatif

Acuan ini merupakan dokumen yang digunakan dalam standar ini. Untuk acuan tak bertanggal berlaku edisi yang terakhir, dan untuk acuan bertanggal, amandemen atau revisi atau publikasinya tidak diperkenankan untuk digunakan.

SNI 2326:2010, *Metode pengambilan contoh pada produk perikanan.*

SNI 01-2332.1-2006, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 1: Penentuan Coliform dan Escherichia coli pada produk perikanan.*

SNI 01-2332.2-2006, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 2: Penentuan Salmonella pada produk perikanan.*

SNI 01-2332.3-2006, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 3: Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada produk perikanan.*

SNI 2332.7:2009, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 7: Penghitungan kapang dan khamir pada produk perikanan.*

SNI 2332.9:2011, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 9: Penentuan Staphylococcus aureus pada produk perikanan.*

SNI 2346:2011, *Petunjuk pengujian organoleptik dan atau sensori pada produk perikanan.*

SNI 01-2354.2-2006, *Cara uji kimia - Bagian 2: Penentuan kadar air pada produk perikanan.*

SNI 01-2354.3-2006, *Cara uji kimia - Bagian 3: Penentuan kadar lemak total pada produk perikanan.*

SNI 2354.5:2011, *Cara uji kimia - Bagian 5: Penentuan kadar logam berat timbal (Pb) dan kadmium (Cd) pada produk perikanan.*

SNI 01-2354.6-2006, *Cara uji kimia - Bagian 6: Penentuan kadar logam berat merkuri (Hg) pada produk perikanan.*

SNI 2354.9:2009, *Cara uji kimia - Bagian 9: Penentuan residu kloramfenikol dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan.*

SNI 2354.10:2009, *Cara uji kimia - Bagian 10: Penentuan kadar histamin dengan spektrofotometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan.*

SNI 2357, *Penentuan kadar arsen pada produk perikanan.*

SNI 2367, *Penentuan kadar timah putih (Sn) pada produk perikanan.*

SNI 2729:2013, *Ikan segar.*

SNI 01-4872.1-2006, *Es untuk penanganan ikan - Bagian 1: Spesifikasi.*

SNI 2725:2013

SNI 7587.1:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang – Bagian 1: Semicarbazide (SEM).*

SNI 7587.2:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang – Bagian 2: Aminohydantoin (AHD).*

SNI 7587.3:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang – Bagian 3: Chloramphenicol (CAP).*

SNI 7587.4:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 4: Metabolit Furazolidone (AOZ).*

SNI 7587.5:2010, *Metode uji residu antibiotik secara enzyme linked immunoassay (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 5: Metabolit Furaltadone (AMOZ).*

3 Istilah dan definisi

3.1

ikan asap

ikan segar yang mengalami perlakuan penyiangan, pencucian dengan atau tanpa perendaman dalam larutan garam, penirisan, dengan atau tanpa pemberian rempah dan pengasapan panas yang dilakukan dalam ruang pengasapan dengan menggunakan kayu, sabut atau tempurung kelapa

3.2

pengasapan panas

proses pengasapan ikan dengan kombinasi suhu dan waktu yang cukup dalam ruang pengasapan untuk membentuk koagulasi protein pada daging ikan, bertujuan untuk membunuh parasit, bakteri patogen yang membahayakan kesehatan manusia

3.3

potensi bahaya

potensi kemungkinan terjadinya bahaya di dalam suatu proses atau pengolahan produk yaitu bahaya yang akan mengakibatkan gangguan terhadap keamanan pangan (*food safety*)

3.4

potensi cacat mutu

potensi kemungkinan terjadinya ketidaksesuaian spesifikasi mutu produk (*wholesomeness*)

4 Syarat bahan baku, bahan penolong dan bahan lainnya

4.1 Bahan baku

4.1.1 Bentuk

Ikan segar dengan mutu yang baik.

4.1.2 Asal

Bahan baku berasal dari perairan yang tidak tercemar.

4.1.3 Mutu

Ikan segar sesuai SNI 2729:2013.

4.2 Bahan Penolong

4.2.1 Air

Air yang dipakai sebagai bahan penolong untuk kegiatan di unit pengolahan memenuhi persyaratan kualitas air minum sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.2.2 Es

Es sesuai SNI 01-4872.1-2006.

4.3 Bahan Lainnya

Bahan lainnya yang digunakan harus *food grade* sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu dan keamanan produk

Persyaratan mutu dan keamanan ikan asap dengan pengasapan panas sesuai Tabel 1.

Tabel 1 - Persyaratan mutu dan keamanan ikan asap dengan pengasapan panas

Parameter uji	Satuan	Persyaratan
a Sensori	-	Min. 7 (skor 1 – 9)
b Kimia		
- Kadar air	%	Maks. 60,0
- Kadar lemak	%	Maks. 20,0
- Histamin***	mg/kg	Maks. 100
c Cemarkan mikroba		
- ALT	koloni/g	Maks. $5,0 \times 10^4$
- <i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
- <i>Salmonella</i>	-	Negatif/25 g
- <i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	Maks. $1,0 \times 10^3$
- Kapang*	koloni/g	Maks. 1×10^2
d Cemarkan logam*		
- Arsen (As)	mg/kg	Maks. 1,0
- Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,1
- Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,5 **
- Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 0,5
- Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 1,0 **
e Residu kimia*		
- Kloramfenikol	-	Tidak boleh ada
- Jumlah malachite green dan leucomalachite green	-	Tidak boleh ada
- Metabolit nitrofurantoin (SEM, AHD, AOS, AMOZ)	-	Tidak boleh ada

Tabel 1 – Lanjutan

Parameter uji	Satuan	Persyaratan
f Cemaran kimia		
- Benzo[a]piren*	µg/kg	Maks. 5
CATATAN * Bila diperlukan ** untuk ikan predator *** jika diperlukan untuk ikan scombroid, clupeidae, pomatomidae, coryphaenidae		

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai SNI 2326:2010.

7 Cara uji

7.1 Sensori

Sensori sesuai SNI 2346:2011. Penilaian sensori sesuai Lampiran A.

7.2 Kimia

- Kadar air sesuai SNI 01-2354.2-2006.
- Kadar lemak sesuai SNI 01-2354.3-2006.
- Histamin sesuai SNI 2354.10:2009.

7.3 Cemaran mikroba

- ALT sesuai SNI 01-2332.3-2006.
- *Escherichia coli* sesuai SNI 01-2332.1-2006.
- *Salmonella* sesuai SNI 01-2332.2-2006.
- *Staphylococcus aureus* sesuai SNI 2332.9:2011.
- Kapang sesuai SNI 2332.7:2009.

7.4 Cemaran logam

- Merkuri sesuai SNI 01-2354.6-2006.
- Kadmium dan Timbal sesuai SNI 2354.5:2011.
- Arsen sesuai SNI 2357.
- Timah putih sesuai SNI 2367.

7.5 Residu kimia

- Kloramfenikol sesuai SNI 7587.3:2010 atau SNI 2354.9:2009.
- Malachite green sesuai Lampiran C.
- Nitrofurantoin (SEM, AHD, AOZ, AMOZ) sesuai SNI 7587.1:2010, SNI 7587.2:2010, SNI 7587.4:2010, SNI 7587.5:2010.

7.6 Cemaran kimia

Benzo[a]piren sesuai Lampiran D.

8 Teknik sanitasi dan higiene

Penanganan, pengolahan, penyimpanan, pendistribusian dan pemasaran ikan asap dengan pengasapan panas menggunakan wadah, cara dan alat yang sesuai dengan persyaratan sanitasi dan higiene dalam unit pengolahan hasil perikanan sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Produk akhir harus bebas dari benda asing yang mengganggu kesehatan manusia.

9 Peralatan

9.1 Jenis peralatan

- a) alat pemotong;
- b) alat pengemas;
- c) bak penampungan;
- d) keranjang;
- e) meja proses;
- f) ruang pengasapan;
- g) talenan;
- h) timbangan.

9.2 Persyaratan peralatan

Semua peralatan dan perlengkapan yang digunakan dalam penanganan dan pengolahan ikan asap dengan pengasapan panas mempunyai permukaan yang halus dan rata, tidak mengelupas, tidak berkarat, tidak merupakan sumber cemaran mikroba, tidak retak, tidak menyerap air, tidak mempengaruhi mutu produk dan mudah dibersihkan. Semua peralatan dalam keadaan bersih sebelum, selama dan sesudah digunakan.

10 Teknik penanganan dan pengolahan

10.1 Penerimaan

10.1.1 Kemasan

- a) Potensi bahaya: terjadinya kontaminasi produk karena kemasan rusak dan ketidakamanan produk karena bahan kemasan *non food grade*.
- b) Potensi cacat mutu: kerusakan fisik karena kemasan rusak.
- c) Tujuan: mendapatkan kemasan yang sesuai spesifikasi kemasan untuk pangan.
- d) Petunjuk: kemasan yang diterima di unit pengolahan diverifikasi terkait keamanan pangan, dan terlindung dari sumber kontaminasi kemudian disimpan pada gudang penyimpanan yang saniter.

10.1.2 Label

- a) Potensi bahaya: *non food grade* karena tidak ada bukti untuk digunakan pada pangan dan kotor karena kesalahan penanganan.
- b) Potensi cacat mutu: -
- c) Tujuan: mendapatkan label yang sesuai spesifikasi label untuk pangan.
- d) Petunjuk: label yang diterima di unit pengolahan diverifikasi terkait peruntukan produknya, kemudian disimpan pada gudang penyimpanan yang saniter.

10.1.3 Bahan baku

- a) Potensi bahaya: ketidakamanan bahan baku karena kontaminasi kimia, bakteri patogen, dan benda asing.
- b) Potensi cacat mutu: tidak sesuai dengan persyaratan mutu yang berlaku.
- c) Tujuan: mendapatkan bahan baku sesuai spesifikasi mutu dan keamanan hasil perikanan.
- d) Petunjuk: bahan baku diuji secara organoleptik dan ditangani secara cepat, cermat dan saniter sesuai dengan prinsip penanganan yang baik dan benar.

10.2 Teknik penanganan dan pengolahan

10.2.1 Bahan baku

- a) Potensi bahaya: kontaminasi kimia, bakteri patogen, dan benda asing karena kesalahan penanganan.
- b) Potensi cacat mutu: kemunduran mutu karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan bahan baku sesuai spesifikasi.
- d) Petunjuk: bahan baku ditangani secara cepat, cermat dan saniter.

10.2.2 Pencucian 1

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri patogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu: kerusakan fisik karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan bahan baku yang bersih sesuai spesifikasi.
- d) Petunjuk: bahan baku dicuci dengan menggunakan air mengalir secara cepat, cermat dan saniter dalam kondisi dingin.

10.2.3 Penyiangan

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri patogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu: kerusakan fisik karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan ikan yang bersih dari isi perut dan atau insang serta mereduksi kontaminasi bakteri patogen.
- d) Petunjuk: ikan segar dibuang isi perut dan atau insang secara cepat, cermat dan saniter dalam kondisi dingin.

10.2.3 Pencucian 2

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri patogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu: kerusakan fisik karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan ikan yang bersih sesuai spesifikasi.
- d) Petunjuk: ikan segar dicuci dengan menggunakan air mengalir secara cepat, cermat dan saniter dalam kondisi dingin. Ikan dapat berbentuk utuh atau *butterfly*.

10.2.4 Penyusunan

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri patogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu: kemunduran mutu karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan bentuk produk sesuai spesifikasi.
- d) Petunjuk: ikan dapat direndam dahulu dalam air garam atau dibumbui rempah, kemudian disusun dalam ruang pengasapan secara cepat, cermat dan saniter.

10.2.5 Pengasapan panas

- a) Potensi bahaya: pertumbuhan bakteri patogen dan parasit karena pengasapan tidak sempurna serta terakumulasinya senyawa benzo[a]piren yang berlebihan.
- b) Potensi cacat mutu: kerusakan fisik karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan ikan asap sesuai spesifikasi
- d) Petunjuk: ikan diasap dalam ruang pengasapan sampai tingkat kematangan sesuai spesifikasi secara cermat dan saniter.

10.2.6 Pendinginan

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri pathogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu: -
- c) Tujuan: menurunkan suhu produk.
- d) Petunjuk: produk didinginkan di tempat tertutup pada suhu ruang sesuai spesifikasi.

10.2.7 Pengemasan

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri patogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu : kerusakan fisik dan kesalahan label.
- c) Tujuan: melindungi produk dari kerusakan fisik selama penyimpanan dan transportasi.
- d) Petunjuk: ikan asap dikemas secara cepat, cermat, saniter sesuai dengan label.

10.2.8 Pemuatan

- a) Potensi bahaya: kontaminasi bakteri patogen karena kurangnya sanitasi dan higiene.
- b) Potensi cacat mutu: kemunduran mutu karena kesalahan penanganan.
- c) Tujuan: mendapatkan produk jadi yang aman dikonsumsi dan melindungi produk jadi dari kerusakan fisik selama pemuatan.
- d) Petunjuk: produk jadi dimuat dalam alat transportasi yang terlindung dari penyebab yang dapat merusak atau menurunkan mutu produk.

11 Syarat pengemasan

11.1 Bahan kemasan

Bahan kemasan untuk produk jadi adalah bersih, tidak mencemari produk yang dikemas, terbuat dari bahan yang baik dan memenuhi persyaratan bagi produk jadi.

11.2 Teknik pengemasan

Produk akhir dikemas dengan cepat, cermat, saniter dan higienis. Pengemasan dilakukan dalam kondisi yang dapat mencegah terjadinya kontaminasi dari luar terhadap produk.

12 Pelabelan

Setiap kemasan produk jadi yang akan diperdagangkan diberi label sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

Lampiran A
(normatif)
Lembar penilaian sensori

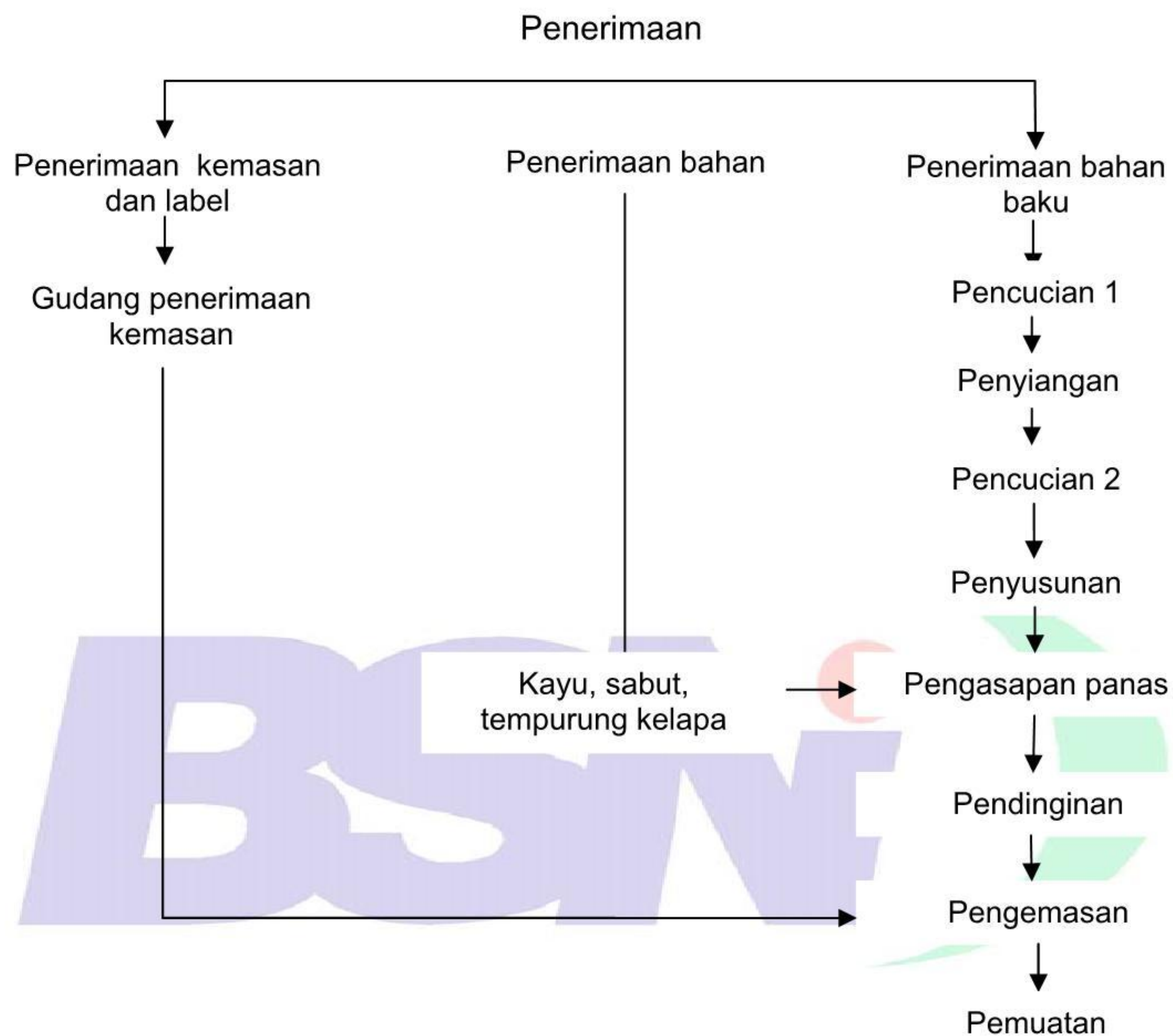
Tabel A.1 - Lembar penilaian sensori ikan asap dengan pengasapan panas

Nama panelis : Tanggal:
Cantumkan kode contoh pada kolom yang tersedia sebelum melakukan pengujian.
Berilah tanda √ pada nilai yang dipilih sesuai kode contoh yang diuji.

Spesifikasi	Nilai	Kode Contoh				
		1	2	3	4	dst
1 Kenampakan						
- Utuh, warna mengkilap spesifik produk	9					
- Utuh, warna kurang mengkilap spesifik produk	7					
- Utuh, warna agak kusam	5					
- Tidak utuh, warna kusam	3					
- Tidak utuh, warna sangat kusam	1					
2 Bau						
- Spesifik ikan asap kuat	9					
- Spesifik ikan asap kurang kuat	7					
- Netral	5					
- Bau tambahan kuat, tercium bau amoniak dan tengik	3					
- Busuk, bau amoniak kuat dan tengik	1					
3 Rasa						
- Spesifik ikan asap kuat	9					
- Spesifik ikan asap kurang kuat	7					
- Hambar	5					
- Getir	3					
- Basi/busuk	1					
4 Tekstur						
- Padat, kompak, antar jaringan sangat erat	9					
- Padat, kompak, antar jaringan cukup erat	7					
- Kurang padat, kurang kompak, antar jaringan kurang erat	5					
- Lembek, antar jaringan longgar	3					
- Sangat lembek, mudah terurai	1					
5 Jamur						
- Tidak ada	9					
- Ada	1					
6 Lendir						
- Tidak ada	9					
- Ada	1					

Lampiran B
(informatif)

Diagram alir proses pengolahan ikan asap dengan pengasapan panas



Gambar B.1 – Diagram alir proses pengolahan ikan asap dengan pengasapan panas

Lampiran C
(normatif)
Metode uji Malachite green dan Leucomalachite green

C.1 Prinsip:

Contoh diekstrak dengan acetonitril setelah terlebih dahulu dikondisikan dengan buffer asetat pH 4,5. Hasil ekstrak dalam acetonitril dipisahkan dengan centrifuge. Ekstrak tersebut diekstraksi cair-cair dengan diklorometana dan air. Fraksi organik diuapkan dengan rotary evaporator. Untuk membersihkan analit dan kotoran dan senyawa-senyawa lain yang tidak diinginkan dilakukan pembersihan (*clean-up*) melalui SPE alumina dan PRS. Analit dielusikan dengan asetonitril-buffer asetat untuk langsung diinjeksikan ke KCKT.

C.2 Peralatan:

- a) Peralatan gelas
- b) *Homogenizer*
- c) Rotoevaporator
- d) *Vortex*
- e) *Column connection adaptor*
- f) *Centrifuge*
- g) Unit membran filter
- h) Unit alat LC/Vis-Fluoresence

C.3 Reagensia:

- a) *Methylen chlorida*
- b) Metanol
- c) Acetonitrile
- d) Water LC
- e) *Deionize water* (> 14 M ohm)
- f) *Glacial acetic acid*
- g) *Sodium acetate* 0.1 M (8.2 g/l)
- h) *p-toluenesulfonic acid* (p-TSA) 1 M (19.02 g p-TSA H₂O dalam 100 ml)
- i) Buffer Acetat : siapkan 1 l Na Acetat 0.1 M, atur pH agar menjadi 4.5 dengan menambahkan 8 mL asam acetat glacial dan 5 ml p-TSA 1M.
- j) *Diethylene glycol*
- i) *Basic Alumina*
- j) *Alumina SPE column*
- k) *Propylsulfonic acid* (PRS-SPE) *column*
- l) *Hydroxylamine Hydrochloride* (HAH) 25 % (25 g /100 ml)
- m) Standar Malachite Green (MG) dan Leucomalachite Green (LMG)

Larutan standar MG dan LMG masing-masing dibuat 1000 µg/mL dalam acetonitril, simpan dalam wadah gelap pada temp dibawah -16 °C. Larutan standar 1 µg/ml dibuat dengan mengencerkan secara bertahap dengan acetonitril. Larutan standar kerja dibuat dengan mengencerkan secara bertahap sampai pada level (2; 4 ;8 dan 16) ng/ml diencerkan dengan *mobile phase* dibuat segar setiap akan dilakukan analisa.

C.4 Prosedur

C.4.1 Penyiapan contoh

- Siapkan *beaker glass* 200 ml.
- Preparasi contoh dan spike sebagai berikut:

Contoh uji	Berat contoh (g)	Larutan standar campuran MG-LMG 500 µg/l yang ditambahkan (µl)
Spike 1 ng/g	5	10
Spike 2 ng/g	5	20
Contoh 1 – n	5	-

- Tambahkan 1,5 ml *HAH* 25%; 2,5 ml *p-TSA* 1 M; 5 ml *acetic buffer* 0.1 M (pH 4,5).
- Homogenkan dengan *homogenizer* selama 1 menit.
- Tambahkan 45 ml *acetonitril*.
- Homogenkan lagi.
- Tambahkan 10 gr *basic alumina*.
- Masukkan ke dalam wadah tertutup kemudian *vortex* selama 1 menit.
- Sentrifuge* pada 3500 rpm selama 10 menit.
- Tuangkan cairan (dekantasi) filtrat ke dalam corong pisah.
- Pada endapan tambahkan lagi 45 ml *acetonitril*.
- Vortex* selama 1 menit.
- Sentrifuge* pada 2500 rpm selama 10 menit.
- Dekantasi filtrat kedalam corong pisah yang sama dengan langkah (8.1.10).

C.4.2 Ekstraksi cair-cair

- Ke dalam corong pisah yang berisi filtrat, tambahkan 100 ml air; 50 ml *dichloromethane*; 2 ml *diethylglycol*.
- Kocok larutan dalam corong pisah selama 1 menit.
- Biarkan memisah selama kurang lebih 15 menit.
- Tampung lapisan bawah dalam labu alas bulat.
- Kedalam corong pisah tambahkan lagi 50 ml *dichloromethane*.
- Kocok lagi selama 1 menit.
- Tampung lapisan bawah ke dalam labu alas bulat yang sama dengan langkah (8.2.4).
- Rotoevaporate* sampai tersisa 2-5 ml.
- Tambahkan 5 ml *acetonitril*.

C.4.3 Pemurnian (Clean-Up)

- Bilas *alumina SPE* dan *PRS-SPE* masing-masing dengan 5 mL *acetonitril*.
- Sambungkan *alumina SPE* diatas *PRS-SPE* dengan *connector*.
- Lewatkan contoh dengan kecepatan 4 ml/min.
- Bilas labu alas bulat dengan 5 ml *acetonitril*.
- Tuang dan lewatkan ke dalam *SPE*.
- Lepaskan sambungan *alumina SPE* setelah semua contoh dilewatkan.
- Bilas *PRS-SPE* dengan 1 ml larutan *acetonitril* : *buffer asetat* (1:1) kemudian buang.
- Elusikan 2,5 ml *mobile phase* kemudian tampung dalam tabung reaksi.
- Masukkan dalam vial.
- Contoh siap di-*inject* ke alat LC/Vis-Floresence.

Catatan : Spike 1 ng/g setara dengan larutan standar 2 ng/ml.
Spike 2 ng/g setara dengan larutan standar 4 ng/ml.

C.5 Kondisi Operasi KCKT

- Column: Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) atau yang setara, seperti C18 Sunfire.
- Detector: Detector I Visible λ= 621 nm untuk MG, diteruskan detektor II Fluoresens Eksitasi λ=265 nm dan Emisi λ= 360 nm.
- Mobile Phase: Asetonitril : buffer asetat pH 4,5 (85 : 15 v/v).
- Flow rate : 1 ml/menit.
- Volume injek : 50 µl.

C.6 Pembacaan larutan standar kerja (sebagai kalibrasi internal rutin)

Baca larutan standar kerja yang sudah disiapkan (7.15.c) pada Instrumen KCKT hingga mendapatkan kurva kalibrasi dengan koefisien regresi 0.9. Apabila hasil pembacaan larutan standar kerja tersebut belum mendapatkan nilai koefisien regresi 0.9 maka harus dilakukan pengecekan terhadap kondisi instrumen dan larutan standar kerja. Jika nilai koefisien regresi telah mencapai lebih dari 0,9 maka kurva standar dengan persamaan $Y = a + bX$ dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi analit dalam contoh. Baca blanko, spike dan contoh yang sudah disiapkan pada 8.3 dengan kondisi operasi instrumen sama pada saat kalibrasi rutin.

C.7 Perhitungan

Kadar malachite green atau Leucomalachite green

$$= \frac{\frac{\text{Area contoh}-\text{Area blanko}}{\text{Area Standar}-\text{Area blanko Std}} \times \text{konsentrasi Std } \left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}}\right) \times \text{volume akhir (ml)}}{\text{Berat contoh (g)}}$$

C.8 Pelaporan

Jika angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi bila lebih dari 5 (lima) pembulatan ke atas.

Contoh: 14,454 dibulatkan menjadi 14,45
14,466 dibulatkan menjadi 14,47

Jika angka ke tiga di belakang koma 5 (lima), dan angka kedua genap, maka angka lima tersebut menjadi hilang tetapi bila angka kedua ganjil maka pembulatan ke atas.

Contoh: 14,765 dibulatkan menjadi 14,76
14,475 dibulatkan menjadi 14,48

Lampiran D (normatif) Metode uji benzo[a]piren

D.1 Bahan

- a) Heterocyclic amine (Amina heterosiklik);
- b) Acridines;
- c) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (hidrokabon aromatik heterosiklik);
- d) Standar Stock Solutions of $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ in methanol utk HAAs dan PANHs (Larutan stok Standar HAAs dan PANHs, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ dalam metanol);
- e) Larutan stok standar PAHs $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ dalam isooktan;
- f) Aniline dan Coronene yang digunakan sebagai standar internal (dengan konsentrasi larutan $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ dalam methanol dan acetonitril);
- g) Diatomaceous earth extraction columns (Kolom ekstraksi tanah diatomae/Extrelut 20 ml merck);
- h) Bond-Elut propylsulfonic acid (PRS;500 mg) dan octadecyl-silane columns (C_{18} ;100 mg);
- i) Diklorometane;
- j) Methanol untuk HPLC/Metanol pro KCKT;
- k) Akuades untuk HPLC/Air pro KCKT;
- l) Silika gel (70-230 mesh);
- m) Hexane;
- n) Filter syringe $0,45 \mu\text{m}$.

D.2 Peralatan

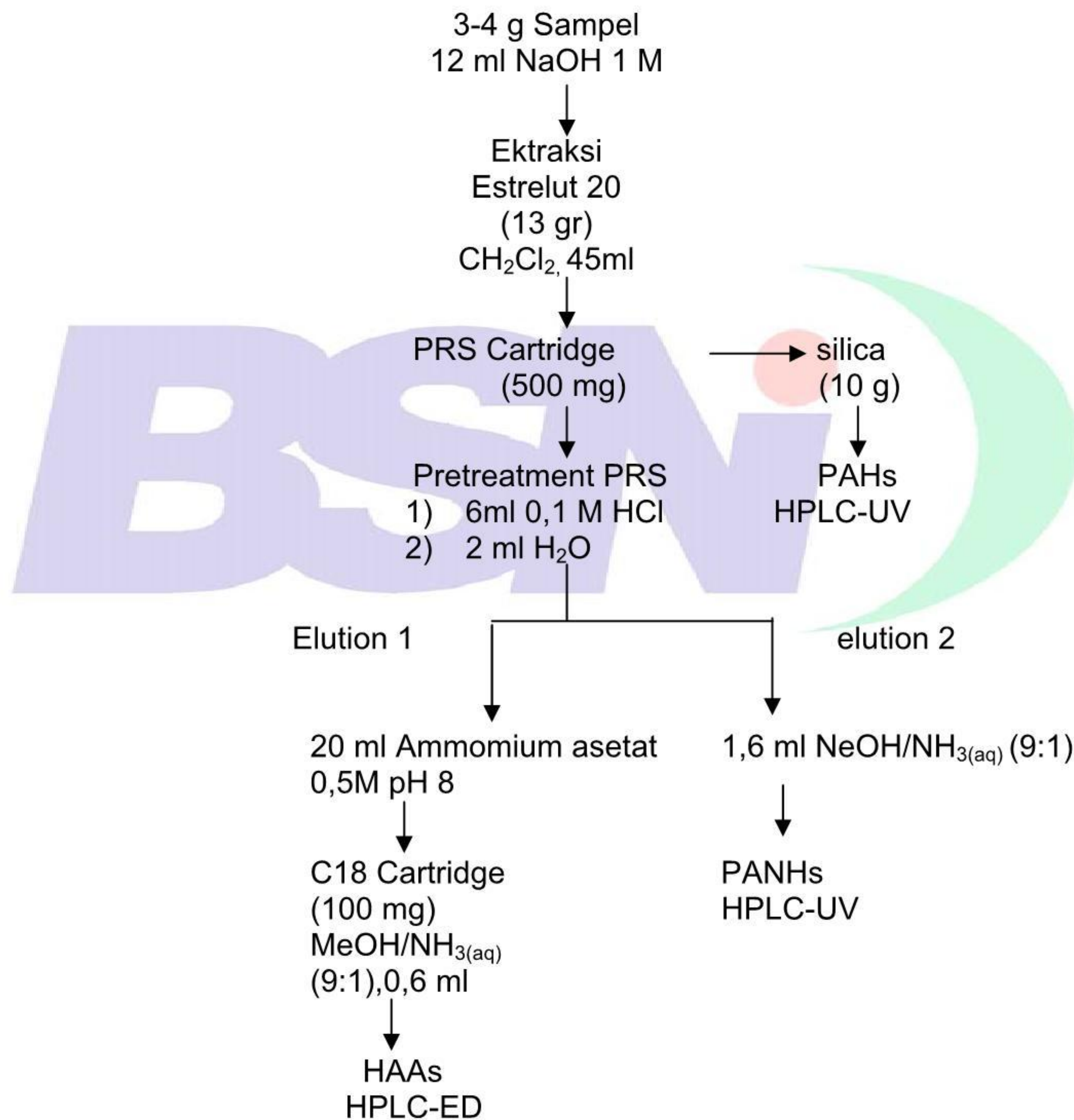
- a) HPLC dgn detektor elektrokimia / KCKT dengan detektor elektrokimia;
- b) HPLC dgn detektor spektrofotometer UV/KCKT dengan detektor KCKT;
- c) GC-MS quadropole-electron impact;
- d) Supelco Visiprep dan Visidry SPE Vacuum Manifold.

D.3 Prosedur

1. Sampel dimurnikan sesuai prosedur yang tertuang dalam gambar 1.
2. Tambahkan 12 ml NaOH 1M kemudian kocok hingga homogen selama 6 jam (safonifikasi).
3. Larutan basa dicampurkan dengan bahan pengisi extrelut, masukan ke dalam kolom extrelut.
4. Pasangkan kolom tanah diatomae (Extrelut 20) dengan kolom propylsulfonic (PRS).
5. Alirkan larutan sampel yang telah disafonifikasi.
6. Alirkan 45 ml dichloromethane (DCM), tampung fraksi terelusi pada wadah tertentu.
7. Fraksi DCM terelusi, yang telah berisi PAHs, diuapkan sampai kering.
8. Larutkan kembali dengan 1 ml Heksana, masukan ke bagian atas kolom silika 10 g yang telah di deaktivasi.
9. Tambahkan/alirkan lg dengan 25 ml Heksana kemudian buang.
10. PAHs dielusi dengan mengalirkan 25 ml Heksana-DCM (60:40) ke dalam kolom.
11. Hilangkan kandungan lemak dari ekstrak akhir.
12. Uapkan pelarutnya dengan cara evaporasi.
13. Larutkan residunya dengan 250 μl metanol, kemudian analisa dengan HPLC-UV.
14. Buang kolom Extrelute, bilas kolom PRS dengan 6 ml HCl 0,1 M dan 2 ml air.
15. Pasangkan kolom PRS dengan kolom C_{18} (100g) yang sebelumnya telah dikondisikan seperti telah dijelaskan.

16. Elusi dengan 20 ml Ammonium Acetat 0,5M, pH 8. Proses ini dalam rangka membuat HAAs akan masuk ke dalam kolom C18, sedangkan PANHs tetap pada kolom PRS.
17. Lepaskan sambungan kedua kolom. Masing-masing kolom dicuci/dibilas dengan 10 ml air.
18. Kemudian HAAs dielusi dengan 0,8 ml Metanol-Ammonia (9:1) sedangkan PAHNs dielusi dengan 2 ml Metanol-Ammonia (9:1).
19. Uapkan pelarut dengan nitrogen evaporator.
20. Larutkan kembali analit HAAs dengan 50 μ l larutan standar internal, sedangkan analit PAHNs dengan 250 μ l larutan standar internal.
21. Lakukan analisis kromatografi menggunakan HPLC dengan kondisi yang telah dijelaskan sebelumnya (8, 17).

D.4 Skema uji



Gambar D.1 - Skema prosedur pembersihan/pemurnian

Bibliografi

Code of Practice of Fish and Fishery Products Second Edition, Adopted 2011. CAC/RCP 52-2003.

Comission Regulation (EC) No. 1881/2006, amending Regulation (EC) No. 466/2001 as regards heavy metals-Official Journal of the European Union.

Council Regulation (EC) No 104/2000 (o) L 17.21.1.2000.p.22-Office for Official Publications of the European Communities

Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor: Hk 00.05.52.4040 tentang Katergori Pangan, Tahun 2006.

Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor: Hk 00.05.55.6497 tentang Bahan Kemasan Pangan, Tahun 2007.

Permenkes No 492/MENKES/PER/IV/2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum.

Rivera Et al – 1996. Solid Phase extraction for the Selective isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes and heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled meat. J. Chrom A, 731 : 85-94.